




## TÍTULO DE PATENTE NO. 220172

**Titular(es):** ADRIANA BRAVO; BEATRIZ SANCHEZ; RAFAEL RANGEL-ALDAO.

**Domicilio(s):** Av. Ppal de Caurimare, Edf. Saint Castin, Apto. 1-C, Caurimare, Caracas, VENEZUELA

**Denominación:** BEBIDA DE MALTA QUE TIENE SABOR ESTABILIZADO Y MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LA MISMA.

**Clasificación:** Int.Cl.6: C12H1/00; C12N1/19; C12N9/02

	<b>Número:</b>	<b>Fecha de presentación:</b>	<b>Fecha:</b>
	PA/a/1996/05184	28 de octubre de 1996	27 de octubre de 1995
	<b>País:</b>		25 de octubre de 1996
	US		
		<b>Número:</b>	
		60/008,915	
		08/738,355	

ESTA PATENTE CONCEDE A SU TITULAR EL DERECHO EXCLUSIVO DE EXPLOTACIÓN DEL INVENTO RECLAMADO EN EL CAPÍTULO REVINDICATORIO Y TIENE UNA VIGENCIA IMPRORROGABLE DE VEINTE AÑOS CONTADOS A PARTIR DE LA FECHA DE PRESENTACIÓN DE LA SOLICITUD.

Fecha de expedición: 28 de abril de 2004

EL DIRECTOR DIVISIONAL DE PATENTES

QUIM. FABIAN R. SALAZAR GARCIA



96584  
220172  
28-04-04

220172  
28/04/04



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

BEBIDA DE MALTA QUE TIENE SABOR ESTABILIZADO Y MÉTODOS DE

PRODUCCIÓN DE LA MISMA

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se relaciona con los campos de la biotecnología y la fabricación de alimentos/bebidas. La invención se refiere a la producción de bebidas de malta, y en forma más particular a la producción de bebidas de malta que tienen estabilidad mejorada del sabor. En particular, la invención se refiere a métodos y composiciones para mejorar la estabilidad del sabor de bebidas de malta fermentada tal como cerveza y a las bebidas de malta producidas por estos métodos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Técnica relacionada

20

***El proceso de elaboración de la cerveza***

25

**Resumen.** En la producción de bebidas de malta, tal como cerveza, un extracto de agua caliente de malta de cebada, con o sin otros granos no transformados en malta tal como arroz o maíz, se hierve con lúpulos, se enfría y luego se somete a la acción fermentativa de la levadura. El agua

REF: 23440



caliente usada para extraer la malta permite la acción de  
varias enzimas en la malta para hidrolizar el almidón en la  
cebada (y en el maíz o arroz) a azúcar fermentable, que  
acciona por la levadura para producir el alcohol en la  
5 bebidas de malta fermentada.

**Conversión en malta.** La malta de cebada se remoja  
con agua para producir malta remojada que se germina a una  
temperatura moderadamente baja. La germinación se lleva a  
10 cabo con el mezclado diario y la adición de agua como se  
necesite, para mantener el contenido de humedad a  
aproximadamente 43 %. La malta verde resultante contiene un  
alto contenido de precursores del sabor de la cerveza,  
componentes del sabor de la cerveza, y agentes colorantes.  
15 Después de que se termina la germinación, la malta verde se  
calienta en un alto contenido de humedad para generar los  
precursores del sabor de la cerveza, los componentes del  
sabor de la cerveza y también para reducir la actividad de  
las enzimas amilolíticas. Después del calentamiento, la  
20 malta se seca hasta un contenido de humedad de 3.5-5.5 % y un  
contenido de proteína soluble de 6.5-8 %. La malta seca  
luego se puede empastar (producir o volver a pasta), para  
producir un mosto que se hierve con lúpulos, se enfría, se  
coloca con levadura de cerveza, y se procesa por los procesos  
25 de fermentación convencionales y en el equipo de fermentación  
convencional.



**Empaste.** La malta, que puede ser de bajo contenido de amilasa, de alto color, etc), se y mezcla con 2.5 a 4 veces su peso de agua caliente grandes y se empasta a 35-40°C durante 5 a 15 minutos hasta que se forma una malta empastada, espesa. A la malta empastada luego se le permite reposar durante 45-90 minutos sin agitación, luego se calienta en pasos a 70-73°C mientras que se agita, con un tiempo permitido en cada paso para que las varias enzimas conviertan los almidones en azúcares fermentables. Siguiendo al calentamiento, la malta empastada se mantiene durante 15-30 minutos, y la temperatura se eleva a 75°C, y la malta empastada se transfiere a una unidad de filtración (lauter).

Si se van a usar los adjuntos de arroz y maíz, se cuecen de manera separada y se obtiene una malta empastada del cocedor. La producción de la malta empastada del cocedor comprende el uso de adjuntos junto con una porción al 10 % - 30 % de malta, (o la adición de enzimas comerciales) para convertir el almidón del material en azúcares fermentables. Los adjuntos y la porción de malta se llevan gradualmente a ebullición y se mantienen ahí hasta que los productos se gelatinizan completamente. Durante las etapas finales del empaste (a las temperaturas más altas), la malta empastada del cocedor y la malta empastada se combinan.

El empaste sirve para un propósito de tres



objetivos. Primero, lleva a la solución aquellas sustancias de malta (y adjuntos) que son fácilmente solubles en agua caliente. Segundo, permite que las enzimas de malta actúen en las sustancias insolubles y las vuelvan solubles. Tercero, proporciona una degradación enzimática de largo alcance de los almidones, proteínas y gomas en productos de menor tamaño y menor peso molecular.

**Filtración en cuba y rocío.** La filtración en cuba consiste de la remoción del líquido, ahora llamado el "mosto", de las cáscaras insolubles o "granos gastados". La filtración en cuba empieza en la terminación del proceso de empaste, con lo cual la malta empastada terminada se transfiere a una cuba de filtración. Ahí se permite reposar durante aproximadamente diez a treinta minutos tiempo durante el cual los granos gastados se asientan al fondo. La cuba de filtración se equipa con un fondo falso que contiene numerosas perforaciones y una salida que conduce al fondo de verdadero de la cuba. La malta empastada luego se deja asentar durante 10-20 minutos y empieza el escurrimiento. El mosto se recicla hasta que está razonablemente claro. El mosto claro luego se bombea hacia una marmita de fermentación. Se introduce agua caliente a través de los granos gastados para enjuagar, o rociar, cualquier mosto restante.

La temperatura de filtración es aproximadamente 72-



77°C tanto para el baño como el agua de rocío. La cantidad de agua de rocío usada es aproximadamente 50-75 % de la cantidad del agua de fermentación.

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

#### **Ebullición y mezclado de lúpulos del mosto:**

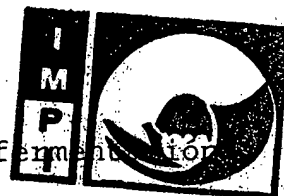
**Fermentación primaria.** El mosto se hierve vigorosamente durante una o dos y media horas en la marmita de fermentación. Se pueden adicionar lúpulos (o extractos de los mismos) en varias etapas del proceso de ebullición, dependiendo de la naturaleza buscada del producto final.

La ebullición del mosto sirve para un número de objetivos, que incluyen (1) concentración del mosto rociado (2) inactivación completa de las enzimas que pueden haber sobrevivido al proceso de empaste final, (3) coagulación y precipitación de las proteínas de alto peso molecular y sólido (llamada "rotura en la marmita" o "rotura térmica") (4) extracción de los constituyentes deseables del lúpulo, y (5) esterilización del mosto.

#### **Enfriamiento, fermentación y almacenamiento:**

**Maduración.** Después de la ebullición, el mosto se cuela para remover los sólidos o "turbiedad", y el mosto luego se enfría a una temperatura de aproximadamente 12-16°C.

La fermentación se inicia cuando el mosto se coloca con la cantidad apropiada de un cultivo puro de levadura de cerveza (típicamente alrededor de 0.32-0.68 Kg/bbl (0.7-1.5

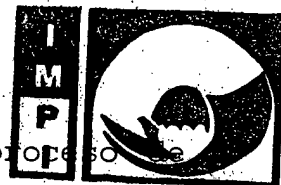


lb/bbl)). Después de 24 horas, se establece la fermentación

y se prosigue, a una velocidad acelerada. La fermentación prosigue típicamente durante aproximadamente 7 días. Durante este periodo, la temperatura del mosto se debe

5 controlar, puesto que el proceso de fermentación provoca que se eleve la temperatura del mosto. Una vez que la levadura ha metabolizado todos los ingredientes fermentables en el mosto, se asienta hacia el fondo y se recupera subsecuentemente y se reciclan para el uso en la colocación a otras caldeadas de cerveza. Conforme el proceso de fermentación llega a una conclusión, la temperatura del mosto empieza a caer. El mosto fermentado (llamado "cerveza verde") se extrae durante el almacenamiento en un tanque de cuarto, frío, o "ruh", donde, su temperatura se disminuye a 10  
15 aproximadamente 0-5°C.

**Procesamiento y envasado.** La cerveza "ruh" se puede dejar permanecer en el tanque ruh para la terminación del proceso de maduración, o se puede transferir hacia un 20 tanque de maduración separado en el asentamiento adicional de cualquier levadura restante y otros sólidos: dependiendo de la cervecería particular, la cerveza se deja madurar desde aproximadamente 14 días hasta aproximadamente 3 meses. Durante este periodo, la cerveza clarifica y se desarrolla su 25 sabor. En la maduración, la cerveza se filtra en general para remover las levaduras y otros sólidos.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

La cerveza puede ser sometida a un proceso de filtración de un paso individual o de paso doble. La filtración de paso doble consiste de dos pasos: una filtración primaria (gruesa), y una filtración secundaria (fina). La cerveza filtrada se almacena subsecuentemente en un tanque determinado.

Para preparar la cerveza para el consumo, se carbonata a un nivel especificado. Luego, dependiendo de la forma del envasado, la cerveza se puede pasteurizar. (En el caso de las cervezas "servidas directamente del tonel", filtradas en frío, se usa un sistema de microfiltración para remover los contaminantes, evitando de este modo el paso de pasteurización). La cerveza envasada en botes y botellas se pasteuriza usualmente, mientras que la cerveza envasada en cuñetes o barriles (y algunas veces botellas) permanece sin pasteurizar. Después del procesamiento final del producto envasado (por ejemplo, etiquetado, etc), la cerveza está lista para el envío al consumidor.

Otros pasos de procesamiento convencionales bien conocidos para aquellos expertos en la técnica se pueden usar en lugar de, o además de, los métodos de fermentación, generales, descritos anteriormente. Por ejemplo, el mosto fermentado se puede diluir con agua para producir una bebida de malta, no alcohólica de bajas calorías (40 ó pocas calorías por 354 ml (12 onzas)), (menos de 0.5 % en volumen de alcohol) que simula cercanamente el sabor, gusto y





Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

sensación en la boca de la cerveza convencional

### Sabor

El sabor es un factor clave en la calidad de una  
5 bebidas de malta tal como la cerveza. Es importante que una  
cerveza mantenga su sabor original, fresco y carácter durante  
la distribución y almacenamiento. De esta manera, los  
sabores equivocados son un gran problema para los fabricantes  
y distribuidores de cerveza. El sabor modificado por la luz  
10 es un sabor equivocado bien conocido formado durante el  
almacenamiento de la cerveza embotellada, como es el sabor  
equivocado causado por la contaminación con microorganismos.  
Otros sabores equivocados que se producen durante el  
almacenamiento se expresan como sabor a papel, similar a  
15 cartón, oxidado, o en general, rancio. A temperatura  
ambiente, el sabor rancio en botella o bote empieza a  
desarrollarse cortamente después del envasado, y se  
incrementa gradualmente y de manera continua hasta el grado  
que la mayoría de los fabricantes norteamericanos de cerveza  
20 hacen volver su producto del mercado si está más de 4 meses  
a partir de la fecha de envasado. Aunque el oxígeno en una  
botella o bote de cerveza se consume típicamente por la  
cerveza en el espacio de 24 horas del envasado, la presencia  
perceptible de un sabor rancio no aparece en general durante  
25 varias semanas.

En el pasado, el sabor rancio de las bebidas de



malta oxidadas, tal como la cerveza, se ha atribuido en general a los efectos combinados de oxidación, luz y calor. Principalmente, los investigadores (que representan sobre el 80 % de la técnica anterior) se han enfocado en métodos para reducir la oxidación en el producto terminado. Por ejemplo, la presente práctica de retrasar la formación del sabor rancio de la cerveza incluye mantener un bajo nivel de aire (u oxígeno) en la cerveza envasada al minimizar el espacio libre de la parte superior o espacio desde la superficie a la parte alta del envase. Las máquinas de llenado de cerveza, modernas se diseñan para lograr niveles de aire muy bajos en el producto envasado. Típicamente, la botella se evacúa antes de que se llene con cerveza, o el aire en la botella evacuada se reemplaza con dióxido de carbono antes del llenado, o se utiliza la sobreespumación de la botella para reemplazar los gases del espacio de la parte superior con la espuma de la cerveza. Todas estas prácticas pueden producir niveles de aire de menos de 0.5 ml por botellas de 358 ml (12 onzas). Pero aún estos niveles bajos de aire permiten aún que la cerveza se oxide en 2-3 meses.

Los sabores equivocados se hacen más obvios cuando la bebida de malta se ha almacenado a temperatura elevada (reacciones térmicas). La influencia negativa de las isohumulonas y melanoidinas en la oxidación de los alcoholes a temperaturas elevadas se ha conocido durante varios años. Ver, por ejemplo, Hashimoto, Rept. Res. Lab. Kirin Brewery

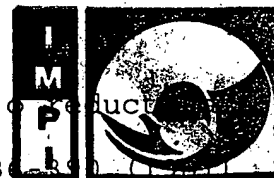


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

Co. Ltd. 19:1 (1979). Sin embargo, aunque la  
almacena idealmente a temperaturas frías, el mantenimiento de  
una temperatura uniformemente fría no siempre es posible  
durante el transporte. Este es un problema particular en  
5 países cálidos y húmedos, donde la temperatura varía de 28-  
38°C, aún más en aquellos países donde no siempre está  
disponible la refrigeración moderna. Por lo tanto, existe  
claramente una necesidad por un método confiable para  
estabilizar el sabor de la cerveza, que no dependa de las  
condiciones ambientales, específicamente controladas, después  
10 de que el producto envasado ha dejado la cervecería.

Se conocen un intervalo amplio de compuestos de  
carbonilo que se reducen durante la fermentación,  
particularmente de la malta y el mosto, y producen sabores  
equivocados. Ver, *Meilgaard y colaboradores, Tech Q. Master*  
15 *Brew. Assoc. Am.* 12:151-168 (1975). Dos rutas biológicas  
controlan el nivel de los compuestos de carbonilo en el  
producto final, la formación de aldehídos a partir de los  
depósitos de oxoácidos y la remoción enzimática de los  
carbonilos del mosto por la levadura de la cerveza.  
20

Se forman alcoholes superiores y los aldehídos  
correspondientes, parcialmente por los procesos anabólicos a  
partir de la fuente principal de carbono y parcialmente a  
través de la ruta catabólica de aminoácidos exógenos.  
25 Además, los aldehídos producidos durante la fermentación,  
empaste y ebullición, se conocen que son substratos



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

potenciales para las aldehído-deshidrogenasas o reductores

Peppard y colaboradores, *J. Inst. Brew.* 87:38 (1991)

Sin embargo, los estudios recientes han indicado que los sistemas reductores de aldehídos son más complejos de lo que

5 se asumió previamente. Ver, *Collins y colaboradores, Proc. Congr. Eur. Brew. Conv.* 23:409-416 (1991) *Kronlof y colaboradores, Proc. Cong. Eur. brew. Conv.* 22:355-362 (1989). Ahora se reconoce que muchos sistemas enzimáticos están comprendidos en la reducción de los compuestos de carbonilo en alcoholes superiores, y que cada sistema opera probablemente con actividades variables durante el transcurso del proceso de fermentación (*Debourg y colaboradores, J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52(3):100-106 (1994). Por ejemplo, los

15 son no estables. Estos compuestos se descomponen a cadenas más cortas, que se someten a la condensación de aldol.

Los aldehídos insaturados, notablemente trans-2-nonenal, y compuestos relacionados comprendidos en la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga se han

20 asociado por mucho tiempo con el sabor rancio en la cerveza. Ver por ejemplo, *Debourg y colaboradores supra*, y la Patente Norteamericana No. 4,110,480. Es bien conocido que la oxidación mediana por enzimas de los ácidos grasos insaturados, tal como ácido linoleico, seguido por la

25 escisión oxidativa o no oxidativa, subsecuente de la cadena de carbono, producirá compuestos activos al sabor que tienen



longitudes de carbonos de 6 a 12. Por lo tanto, los intentos para estabilizar el sabor de la bebida de malta fermentada se han enfocado en algunos casos, en la modificación de los lípidos comprendidos en el proceso de fermentación. Sin embargo, en la cerveza, los lípidos se derivan a partir de la malta de varias formas que incluyen los lípidos simples (ácidos grasos, triglicéridos y otros lípidos neutrales), lípidos complejos (glicolípidos y fosfolípidos) y lípidos unidos tal como aquellos unidos a los granos de almidón.

Se han hecho numerosos métodos para remover los lípidos de las materias primas, incluyendo (1) remoción del germen del grano, que contiene una porción significativa de lípidos encontrados en los cereales de la materia prima (clarificación), (2) remoción de los lípidos a partir de cereales de la materia prima por extracción con etanol, (3) pretratamiento de los granos de los cereales de la materia prima con una enzima de descomposición de lípidos (Patente Japonesa examinada No. de publicación 2248/1973, Patente Japonesa no examinada No. de publicación 55069/1987 y (4) remoción de los lípidos por una separación con filtración especial (Patente Norteamericana No. 5,460,836). Sin embargo, no todos los lípidos tienen un efecto adverso, es decir, el equilibrio de estas formas de lípidos afecta imperceptiblemente la calidad de la cerveza y la eficiencia del proceso de fermentación de la cerveza. De esta manera,



**Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial**

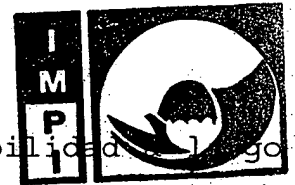
aún después de años de estudio, permanece desconocido si el equilibrio es apropiado, o cómo la alteración del contenido total de lípidos afectará la estabilidad del producto terminado, almacenado.

5                    Otra técnica reconocida para estabilizar la cerveza contra la oxidación es adicionar un eliminador de oxígeno, tal como dióxido de azufre, usualmente en la forma de bisulfito, a la cerveza. El dióxido de azufre se produce por la levadura durante la fermentación y se combinarán con carbonilos para formar componentes de adición de bisulfito que son hidrofílicos, y de esta manera menos volátiles. Sin embargo, aunque efectivo, el incremento de la concentración de  $\text{SO}_2$ , de manera natural o artificial, puede ser comercialmente inaceptable. En los Estados Unidos de

10                    Norteamérica, por ejemplo, el  $\text{SO}_2$  se limita por la ley a menos de 10 ppm, y aún aquellos niveles bajos producen aromas indeseables y de azufre en algunas cervezas, mientras que en otros países, tal como Alemania, se prohíbe cualquier adición de  $\text{SO}_2$  exógeno.

20                    Aún si se permite, la adición de bisulfito, que trabaja al unirse a los aldehídos, no es una panacea. La cerveza es un producto complejo que comprende, muchos aldehídos muy diferentes (notablemente acetaldehído, un producto normal de fermentación), por lo tanto, la acción de un aditivo de sulfito frecuentemente se disminuye. La

25                    adición de otros eliminadores de oxígeno también se ha



**Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial**

intentado, pero con poco efecto en la estabilidad a largo plazo del sabor en la bebida de malta fermentada.

En vista de la técnica anterior y los resultados de la búsqueda, sin embargo, el sabor de la cerveza aún se vuelve rancio. De esta manera, es claro que hasta la presente invención, permaneció una necesidad percibida por largo tiempo en la técnica por un método confiable para estabilizar el sabor de las bebidas de malta fermentada, que tenga las siguientes características. (1) No altere de manera significativa el sabor fresco deseable del producto terminado, (2) no disminuya significativamente la eficiencia del proceso de fermentación, (3) no viole la ley o regulación con respecto a la adición de aditivos o conservadores y (4) no dependa del mantenimiento de condiciones ambientales específicas para el transporte y almacenamiento del producto envasado.

Los presentes inventores han desarrollado un método completamente nuevo para estabilizar el sabor de la malta fermentada al enfocarse a un aspecto de la reacción de fermentación no considerado previamente en la técnica anterior. La presente invención demuestra que los sabores de malta fermentada se pueden estabilizar por el uso de inhibidores, bloqueadores o agentes reductores de los compuestos intermedios de la reacción de Maillard, tal como la enzima dependiente de NADPH, 3-desoxiglucosona reductasa, o aminoguanidina.



A fin de evaluar la estabilidad de los sabores inventores encontraron que es esencial tener un método sensible, rápido y reproducible con el cual se puede analizar los cambios en el sabor de la cerveza. La prueba sensitiva ha sido el medio tradicional disponible para valorar la calidad organoléptica de la cerveza. La prueba del gusto, aunque sensible sufre de las limitaciones humanas, tal como la inclinación del personal y la tendencia a hacer evaluaciones comparativas (subjetivas) antes que objetivas (Mathews y colaboradores, *Trends in Food Science & Technol.* 4:89-91 (1990)). El Instituto de Tecnología de la Elaboración de la Cerveza empieza usando análisis de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) de acuerdo a por ejemplo Greenhoff y Wheeler, *J. Inst. Brew* 86:35 (1981); Strating y Drost, *Dev, in Food Sci.* 17:109-121 (1988). Se aplicaron métodos mejorados que utilizan técnicas de purgación y trampa, cromatografía de gases, y detección selectiva de masa usando la técnica SIM, para establecer alta capacidad y mejor separación, determinación e identificación. Ver, por ejemplo, Narziß y c) *MBAA Tech. Q.* 30:48-53 (1993). Sin embargo, las mediciones objetivas de un parámetro de calidad particular están sin sentido a menos que se correlacionen a la respuesta humana a la bebida como un todo, cuando se compra y consume bajo condiciones normales.

De esta manera, los presentes inventores desarrollaron un sistema por el cual se podría evaluar el





Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

deterioro organoléptico de la cerveza, por índices analíticos que proporcionan una serie de compuestos (ver Figura 1) que representan un continuo reproducible de formas frescas a deterioradas (rancia). Estos índices analíticos luego se relacionan a las evaluaciones organolépticas, como se demuestra en las Figuras 2a y 2b, para proporcionar una correlación entre las medidas objetivas y organolépticas de la frescura del sabor. Bravo y colaboradores, IBTC Technical Consortium Meeting # 35, Salzburg, Austria, Septiembre de 1993; Bravo y colaboradores IBTC Technical Consortium Meeting # 36, Caracas, Venezuela, Noviembre de 1994. Estos compuestos participan en las reacciones comprendidas en el procesamiento de ranciamiento de la cerveza (substratos, y productos intermedios o finales), pero no necesariamente producen el sabor rancio. Estos índices analíticos son relativamente fáciles de detectar y muestran un cambio significativo en sus áreas máximas relativas durante el proceso de envejecimiento (ver Figuras 2a y 2b).

La concentración de furfural, 5-metilfurfurilo, 2-acetilfurano y 5-hidroximetilfurfurano son índice útiles para medir el daño térmico en la cerveza. Por ejemplo, en un esfuerzo para establecer una "prueba de deterioro de la calidad", se han desarrollado métodos para detectar el furfural y 5-metilfurfurilo en jugos de frutas durante el almacenamiento. Harayama y colaboradores Agric. Biol. Chem. 53:393-398 (1991) encontraron por análisis de multivariable



del sabor equivocado en los compuestos volátiles en el espacio de la parte superior formados durante el almacenamiento de la cerveza, que ciertos compuestos de furfural fueron un índice valioso para medir un sabor de cartón, particular en la cerveza. Grongvist y colaboradores, *EBC Cong.* 421-428 (1993), usando cromatografía de gases para medir los compuestos de carbonilo presentes durante la producción y envejecimiento de la cerveza, encontraron que la concentración de furfural se incrementó significativamente durante el envejecimiento.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los presentes inventores, deduciendo que los productos formados durante la reacción de Maillard se podrían usar como índices del envejecimiento o maduración de la cerveza, desarrollaron un método, (usando los índices medidos por una combinación de electrofóresis capilar y técnicas de HPLC) para inspeccionar de manera confiable la estabilidad del sabor y el efecto organoléptico del envejecimiento en la cerveza (Bravo y colaboradores, IBTC Technical Consortium Meeting # 35, Salzburg, Austria, Septiembre de 1993; Bravo y colaboradores IBTC Technical Consortium Meetin # 36, Caracas, Venezuela, Noviembre de 1994). Al utilizar el método para la detección de los índices químicos pertinentes, los presentes inventores desarrollaron un nuevo sistema, avanzado significativamente sobre aquellos descritos y usados hasta la fecha, para valorar de manera confiable y eficientemente el grado de frescura de la cerveza, y para determinar las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura) de una cerveza expuesta a un ambiente previamente desconocido. Además, los presentes inventores han utilizado estos sistemas analíticos para desarrollar métodos para mejorar la estabilidad del sabor de las bebidas de malta tal como la cerveza, y para producir bebidas de malta por estos métodos.

En las investigaciones iniciales diseñadas para solucionar los problemas descritos anteriormente, se



descubrió que al regular enzimáticamente la producción de ciertos compuestos intermedios de la reacción de Maillard formados durante el proceso de fermentación, se puede producir confiablemente una bebida de malta fermentada, que  
5 tiene un gusto refrescantemente puro y estabilidad mejorada del sabor. Los presentes inventores hicieron investigaciones adicionales en base a este hallazgo y desarrollaron la presente invención.

La presente invención se refiere a la producción de  
10 bebidas de malta que tienen estabilidad mejorada del sabor. La invención tiene utilidad particular en la producción de bebidas de malta fermentada tal como cerveza, aunque la invención también se puede usar ventajosamente en la producción de otras bebidas de malta con sabor. La invención  
15 se refiere adicionalmente a métodos de fermentación o elaboración de cerveza, para producir bebidas de malta fermentada, tal como cerveza, las bebidas preparadas por este método, y las bebidas que tienen un sabor sustancialmente estabilizado. En particular, la presente invención se  
20 refiere a un método para estabilizar el sabor de una bebida de malta fermentada, en forma más particular una cerveza, por la adición de una enzima de oxoaldehído reductasa, la bebida de malta fermentada preparada por este método, y una bebida de malta fermentada que tiene estabilidad mejorada del sabor.

25 La invención se refiere además al uso, durante el proceso de fermentación, de enzimas de oxoaldehído reductasa



a partir de fuentes naturales, que incluyen aquellas producidas por levaduras, para estabilizar el sabor del producto de cerveza resultante y para producir una cerveza que tiene un sabor estable. También se refiere a microorganismos, particularmente levaduras, que se han modificado específicamente, se han seleccionado o manejado genéticamente para expresar o segregar una enzima de oxoaldehído reductasa que se puede usar durante el proceso de fermentación para estabilizar el sabor del producto de cerveza resultante y para producir una cerveza que tiene un sabor estable.

La presente invención también proporciona un método para mejorar la estabilidad del sabor de una bebida de malta. De acuerdo con la presente invención, este método es adecuado para mejorar la estabilidad del sabor de una bebida de malta fermentada, en particular, la cerveza. De esta manera, es un objeto de la presente invención proporcionar un método de fermentación o preparación de cerveza, en donde se mejora la estabilidad del sabor de la cerveza.

La presente invención proporciona además las bebidas de malta preparadas por estos métodos. De acuerdo con la presente invención, la bebida de malta proporcionada de esta manera es una bebida de malta fermentada, particularmente una cerveza. De esta manera, es un objeto de la presente invención proporcionar una cerveza en la cual se ha mejorado la estabilidad del sabor.



La presente invención también proporciona extractos a partir de una fuente natural (por ejemplo, levadura, levadura modificada o extracto de la misma, que proporciona una cantidad suficiente de las enzimas necesarias para bloquear, inhibir o reducir los compuestos intermedios de la reacción de Maillard (por ejemplo, 3-desoxiglucosona), que da por resultado la formación del sabor rancio en las bebidas de malta fermentada.

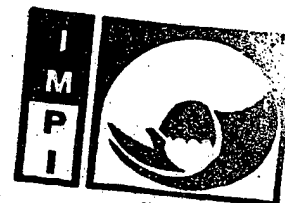
Aún otros objetos y ventajas de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cromatograma de una cerveza fresca que muestra los índices químicos del envejecimiento de la cerveza: LCI, LC11, LC18 y 5-HMF.

Figura 2. a: Gráfica que muestra los cambios en la intensidad de la altura máxima de LC18 durante el almacenamiento a 5°C y su correlación con la evaluación del sabor. El LC18 se consume a bajas temperaturas y tiende a desaparecer con el tiempo.

b: Gráfica que muestra los cambios en la concentración de 5-HMF durante el almacenamiento de la cerveza a 28°C, y su correlación invertida con el grado de



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

oxidación.

Figura 3. Diagrama del mecanismo propuesto de formación de LC18 en la cerveza, y su posible complicación en el deterioro del sabor. El LC18 es un precursor del compuesto de dicarbonilo de 5-HMF que también puede condensarse con aminoácidos a través de la degradación de Strecker para producir aldehídos y pirroles o pirazinas (CF).

Figura 4. Cromatograma de un sistema modelo de glucosa-glicina tratado con calor, que consiste de glucosa 1M + glicina 0.5 M, después de 3 horas de reacción a 90°C, que demuestra la adquisición de los índices analíticos del envejecimiento de la cerveza (LC8, LC11 y LC18) en un sistema modelo.

Figura 5. Cromatograma compuesto que demuestra el efecto de la adición de 1,2-fenilendiamina al mosto. A: mosto; B. mosto + 1,2-fenilendiamina. La adición de 1,2-fenilendiamina provoca una reducción específica en el valor máximo de LC18.

Figura 6. a: Gráfica de barras que demuestra los cambios en el área de las quinoxalinas hidrofóbicas que acompañan el almacenamiento de la cerveza a 5°C y 28°C durante 15 días y a 60°C durante 3 días.



b: Gráfica de barras que muestra los cambios en el área de las quinoxalinas hidrofílicas que acompañan el almacenamiento de la cerveza a 5°C y 28°C durante 15 días y 60°C durante e días.

5

Figura 7. Esquema del procedimiento de purificación de la enzima reductasa. Amortiguador A: fosfato de potasio 25 mM, pH 7.5. Amortiguador B: fosfato de potasio 5 mM, pH 6.5. Amortiguador C: fosfato de potasio 25 mM, pH 7.0.

10

Figura 8. Perfil de elución de reductasa 1 en cromatografía de Sephacryl S-200. Comienzo: electrofóresis de gel de SDS-poliacrilamida de reductasa 1. El gel se coloreo con azul brillante de Comassie.

15

Figura 9. Perfil de elución de reductasa 2 en cromatografía de Sephacryl S-200. Comienzo: electrofóresis de gel de SDS-poliacrilamida de reductasa 2. El gel se coloreo con azul brillante de Coomassie.

20

Figura 10. La especificidades de substrato de las enzimas reductasa 1 y reductasa 2.

25

Figura 11. Cromatograma compuesto que muestra la disminución en el valor máximo de LC18 en la cerveza después de la adición de las reductasa 1 y 2 aisladas a partir de la





Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

levadura de cerveza.

Figura 12. Gráficas de barras que muestran los grados de frescura determinados organolépticamente de las cervezas tratadas con reductasa 1. Las cervezas se incubaron con una mezcla de amortiguador C, NADPH (cervezas de control) y reductasa 1 (cervezas experimentales) durante 15 días a 28°C (panel a) ó 3 días a 60°C (panel b).

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

##### Definiciones

A todo lo largo de esta descripción, se usan varios términos que se entienden en general por aquellos expertos en la técnica aplicable. Se usan varios términos con significado específico, sin embargo, y se proponen para querer decir como se define por lo siguiente:

Como se usa en la presente, el término "malta" se propone para referirse a cualquier grano de cereal, particularmente cebada, remojado en agua hasta que se germina y se usa en la fermentación y destilación.

El término "malta empastada" como se usa en la presente se define como malta o grano triturado, remojado en agua caliente hasta hacer mosto.

El término "mosto" como se usa en la presente se



define como el escurrimiento de licor desmenuado de la extracción de un material sólido preparado, tal como **Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial** o malta de cereal, con agua caliente.

Como se usa en la presente, el término "bebida de malta fermentada" se propone como cualquier bebida con sabor a malta producida por fermentación, tal como cerveza o sake.

Como se usa en la presente, el término "cerveza" se define como una bebida alcohólica fermentada a partir de malta y lúpulos. El término como se usa en la presente se propone para incluir cervezas espesas y amargas, cervezas fuertes de malta, cervezas añejas, cervezas amargas y fuertes, licores de malta, licores mezclados bajos en calorías, de bajo contenido de alcohol y ligeras, y similares.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

### La reacción de Maillard

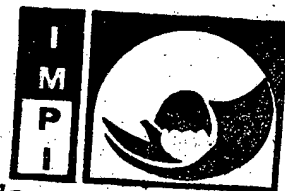
Hace más de 80 años, Luis Maillard primero la reacción para reducir los azúcares con los grupos amino libres de los aminoácidos y proteínas. Esta reacción compleja, llamada la reacción de Maillard, o coloración de color café, no enzimática, es responsable por el aroma y gusto en los alimentos cocidos o conservados. Específicamente, se conoce que está comprendida en el color y aroma resultantes de las bebidas de malta fermentada, tal como la cerveza o sake.

Como se gráfica en la Figura 3, la reacción de Maillard se inicia por la reacción de las aminas primarias (a partir de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos) con azúcares para formar aminas (bases de Schiff) que se someten adicionalmente al rearreglo para formar los productos de Amadori, que son responsables por la coloración de color café y el proceso fluorescente, que da por resultado subsecuentemente la formación de numerosos productos terminales de glucosilación, avanzada. Ampliamente, los productos terminales de glucosilación avanzada se llaman compuestos intermedios de  $\alpha$ -carbonilo, que incluyen, por ejemplo, 1-desoxidicetas y 3-desoxialdocetas. Cuando el azúcar reducido es glucosa, como en la fermentación de la malta, uno de los compuestos intermedios de  $\alpha$ -carbonilo es 3-desoxiglucosona.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

Miles de compuestos, que incluyen alevina, polipéptidos, alcoholes, polifenoles, pirroles, isomaltas, melanoides, ácidos grasos y aldehídos, así como precursores y compuestos intermedios relacionados, están comprendidos durante el proceso de fermentación en la reacción de Maillard. Por ejemplo, existen sobre 140 reductasas y deshidrogenasas en la superfamilia de las reductasas comprendidas en la reacción de Maillard. Sin embargo, antes de la presente invención, no hay sugerencia en la técnica anterior que al regular enzimáticamente la producción de un compuesto intermedio específico de la reacción de Maillard, se podría estabilizar efectivamente el sabor de la cerveza. Además, el uso de una reductasa específica como una ayuda de procesamiento, enzimática, regulatoria en la producción de cerveza no se ha sugerido hasta ahora. Históricamente, la mayoría de los ensayos para probar la estabilidad del sabor de la cerveza han sido puramente subjetivos (por ejemplo, paneles clásicos de catadores de cerveza) y no han sido conducentes a la cuantificación. Por lo tanto, fue necesario para los presentes inventores desarrollar primero un ensayo fiable, objetivo, analítico para determinar la estabilidad del sabor de la muestra, que se podría usar además de las evaluaciones organolépticas, antes de que nuevos procedimientos se puedan implementar o aditivos caracterizados en términos de sus efectos en la estabilidad del sabor.



### Los atributos de las bebidas de malta fermentada.

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

Las bebidas de malta, especialmente la cerveza, poseen atributos fácilmente perceptibles por el consumidor.

5 Estos atributos incluyen espuma, sabor y claridad. De estos, el sabor es finalmente la característica más importante para el consumidor.

10 El sabor (pureza) y el gusto posterior (sensación refrescante) se miden típicamente dentro de la industria como que tienen uno de los siguientes cinco grados:

1: Gusto no muy claro y gusto posterior no tiene sensación refrescante.

2: Gusto no es claro y gusto posterior tiene sensación casi no refrescante.

15 3: Usual.

4: Gusto es claro y sabor posterior tiene sensación refrescante.

5: Gusto es muy claro y sabor posterior tiene sensación muy refrescante.

20 La estabilidad del sabor se evalúa típicamente en el producto envasado, almacenado (usualmente a una temperatura de almacenamiento de 40°C) como que tiene uno de los siguientes cinco grados:

1: Significativamente rancio.

25 2: Rancio.

3: Usual.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

4: Fresco.

5: Muy fresco.

Además, un número creciente de consumidores desean un producto de cerveza completamente natural que demuestre las cualidades anteriores y que aún esté totalmente libre de aditivos o suplementos artificiales.

Se conoce en la técnica que la cebada malteada se puede reemplazar en su totalidad o en parte por un llamado "adjunto de fermentación". Los adjuntos de fermentación, adecuados incluyen maíz, arroz, azúcar y varios jarabes. Un adjunto de fermentación usado en la producción de un mosto, tal como maíz, usualmente se tritura y una malta empastada formada de manera separada a partir de la malta empastada al adicionar enzimas. Los productos prehidrolizados se pueden mezclar con la malta empastada, y se pueden adicionar jarabes al mosto en el momento en que el mosto esté hirviendo como se describe anteriormente. El uso de adjuntos de fermentación necesita ser cuidadosamente controlado a fin de producir una cerveza de gusto y color aceptable. El uso de adjuntos hechos a partir de maíz, arroz y otros granos extienden los ingredientes de fermentación más allá de los tradicionales y listados anteriormente. Sin embargo, un planteamiento no es posible en ciertos países, por ejemplo, en Alemania, aún se sigue la ley de la pureza de la cerveza promulgada en 1516 (la "Reinheitsgeböt") que limita los ingredientes de fermentación a malta de cebada, agua, lúpulos y levadura.



Los compuestos adicionados a la mezcla de mosto antes del paso de fermentación primaria se llaman "procesamiento". Por otra parte, los compuestos adicionados a la mezcla del mosto después del paso de fermentación primaria se llaman "aditivos". La diferencia entre los dos es significativa debido a que el uso de aditivos se regula, mientras que el uso de ayudas de procesamiento no se regula.

Por los métodos de la presente invención, se usa una cantidad estabilizadora del sabor de al menos una enzima de oxoaldehído reductasa como un aditivo para la bebida de malta fermentada. Este aditivo de enzima proporciona estabilización mejorada del sabor de la bebida de malta fermentada, terminada.

La(s) enzima(s) de oxoaldehído reductasa se puede(n) adicionar en cualquier etapa del proceso de fermentación, que incluyen a la malta de grano, al mosto antes de la fermentación, al mosto fermentado, a la bebida de malta fermentada antes del procesamiento, o a la bebida de malta fermentada, procesada antes del envasado. En la forma más preferente, la enzima de oxoaldehído reductasa se adiciona al mosto antes de la fermentación a la bebida de malta fermentada antes del procesamiento, a la bebida de malta fermentada, procesada antes del envasado.

Preferentemente, las enzimas de oxoaldehído reductasa son de origen natural. Las enzimas se pueden aislar usando procedimientos conocidos de extracción de



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

proteínas a partir de un número de fuentes, y se pueden purificar como se describe posteriormente y luego se adicionan a la bebida de fermentación como una ayuda al procesamiento y/o como un aditivo. Este esquema, las enzimas de reductasa se pueden adicionar al proceso de fermentación de manera continua o como una inyección individual. Los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo usando ya sea enzimas de longitud completa, o fragmentos biológicamente activos de las mismas. Como una forma alternativa de la enzima, se pueden usar ciertas oxoaldehído reductasas de longitud completa o atenuadas, sintéticamente formuladas, en lugar de las enzimas naturales para estabilizar el sabor del producto de malta fermentada, mientras que la forma de enzima alternativa posea la actividad biológica de la enzima de oxoaldehído reductasa, natural.

Preferentemente, la enzima de oxoaldehído reductasa aislada y purificada por, o usada en, los métodos de la presente invención es una enzima dependiente de NADPH. En la forma más preferente, la enzima de oxoaldehído reductasa es 3-desoxiglucosona reductasa.

Las enzimas de oxoaldehído reductasa naturales se aíslan preferentemente a partir de células de levadura usando procedimientos de extracción de rutina de proteínas como se expone en el Ejemplo 1 posterior, o a partir de fuentes animales o vegetales. Se prefieren como las fuentes de





oxoaldehído reductasa, naturales, las células de levadura, incluyendo las levaduras de la cerveza o de cebada, por ejemplo, del género *Saccharomyces*, en la forma más preferente de las especies *Saccharomyces cerevesiae*.

5 La enzima de oxoaldehído reductasa aislada a partir de fuentes naturales se puede purificar por técnicas de purificación de proteínas que son de rutina para aquellos expertos en la técnica. En forma preferente, las enzimas se purifican por una combinación de "desplazamiento salino" y purificación cromatográfica tal como cromatografía líquida 10 HPLC, FPLC, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, y cromatografía de inmunoafinidad. En la forma más preferente, las enzimas purificadas se purifican por una combinación de precipitación de sulfato de amonio y purificación de HPLC o 15 FPLC. Estas enzimas de oxoaldehído reductasa purificadas luego se pueden adicionar al producto, en las cantidades estabilizadoras del sabor como se describe anteriormente, para mejorar la estabilidad del sabor de bebida de malta fermentada. 20

En una modalidad alternativa, se pueden adicionar al producto sin purificación las preparaciones crudas de las oxoaldehído reductasa. Las preparaciones crudas abarcadas por esta modalidad de la invención incluyen extractos o 25 productos de digestión de la levadura natural, fuentes animales o vegetales. Preferible es un producto de digestión



enzimático o extracto de células de levadura naturales o modificadas genéticamente (como se describe posteriormente) que incluyen células del género *Saccharomyces*, y en la forma más preferente de las especies *Saccharomyces cerevisiae*. Los métodos para preparar estos extractos y productos de digestión enzimáticos se describen bien en la literatura microbiológica (ver por ejemplo *Difco Manual*, Difco, Inc., Norwood, Massachusetts).

En otra modalidad alternativa, las fuentes (tal como levadura) capaces de producir enzimas de oxoaldehído reductasa se pueden adicionar per se en una cantidad suficiente para producir una cantidad efectiva de la oxoaldehído reductasa in situ para estabilizar el sabor del producto terminado. Estas fuentes también se pueden usar para preparar una preparación cruda, en forma preferente un extracto o producto de digestión, enzimático, que comprende cantidades mejoradas de una enzima de oxoaldehído reductasa, que luego se usa como se describe anteriormente para estabilizar el sabor de la bebida de malta fermentada. En forma preferente, las levaduras del género *Saccharomyces* y en forma más preferente de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, se usan en esta modalidad.

En aún otra modalidad, células de levadura, preferentemente del género *Saccharomyces*, y en la forma más preferente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, se modifican genéticamente para producir cantidades mejoradas de



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

oxoaldehído reductasa con relación a sus cepas tipo  
o padres. Los métodos para modificar genéticamente las  
células de levadura y otros microorganismos son bien  
conocidos y de rutina para aquellos expertos en la técnica  
5 (ver, por ejemplo Watson, J. D., y colaboradores en:  
*Recombinant DNA*, 2a. Ed., New York: Scientific American  
Books, pp. 235-253 (1992)). Estas levaduras modificadas  
genéticamente proporcionan una fuente fácilmente adecuada de  
la reductasa (como una preparación cruda o purificada) que se  
10 va adicionar durante el proceso de fermentación. En la  
alternativa, como en las modalidades previas, la levadura  
genéticamente modificada que tiene la expresión mejorada de  
oxoaldehído reductasa se puede adicionar per se en una  
cantidad suficiente para proporcionar estabilización in situ  
15 del sabor en el producto de malta terminado.

Si se adiciona per se, las células de levadura  
capaces de producir oxoaldehído reductasa se pueden  
inmovilizar en un portador de fase sólida, a una densidad  
suficiente para proporcionar suficiente ayuda enzimática para  
20 estabilizar sustancialmente el sabor de la bebida de malta  
fermentada, terminada. El portador es importante en términos  
de la provisión de un ambiente adecuado para el crecimiento  
de la levadura y el contacto con el substrato acuoso. Los  
materiales usados para proporcionar un portador pueden  
25 incluir, por ejemplo, cuentas de alginato (que proporcionan  
un portador similar a un gel), partículas de látex, o



gránulos de DEAE-celulosa. Las células de levadura se pueden inmovilizar en un portador y cultivar de acuerdo con cualquier medio conocido en la técnica (ver por ejemplo Patente Norteamericana No. 5,079,011).

5 Las cantidades óptimas de la oxoaldehído reductasa, necesarias para estabilizar el sabor del producto de malta terminado se determinaron usando los métodos analíticos expuestos en los ejemplos posteriores. De acuerdo con estos métodos, la concentración óptima varía para las enzimas de oxoaldehído reductasa en la bebida de malta terminada son de aproximadamente 5-500 unidades/ml, en forma preferente cerca de 10-250 unidades/ml, en forma más preferente de aproximadamente 25-100 unidades/ml y en la forma más preferente de aproximadamente 50 unidades/ml. Como se usa en  
15 la presente una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 micro mol de NADPH por minuto a 25 C. Se debe señalar que mientras que estos intervalos se describen en términos de una oxoaldehído reductasa dependiente de NADPH, particular, los métodos de la presente invención contemplan la adición de otras proteínas  
20 estabilizadoras del sabor, de manera simultánea, secuencial, o por la inyección individual de dos o más componentes premezclados.

Habiendo ahora descrito la presente invención en  
25 detalle, la misma será más entendida claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen a la



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

misma para propósitos de ilustración solamente propone que sean limitantes de la invención.

### *Ejemplos*

#### 5 *Materiales y Métodos.*

Los siguientes materiales y métodos se usaron en general en los Ejemplos.

#### Prueba Organoléptica.

10 La prueba organoléptica se diseñó para dar una indicación de la estabilidad de la cerveza en botella, como se determina por los métodos subjetivos (por ejemplo, "prueba de gusto"). En este planteamiento, la cerveza filtrada, tratada con enzimas se empaca en botellas de 275  
15 ml, estándar, y las muestras se someten a un ciclo alternante de enfriamiento (0°C durante 24 horas) y calentamiento (40°C durante 24 horas). El sabor de la cerveza luego se evalúa organolépticamente por catadores experimentados. Una muestra de control de la cerveza no tratada con enzima se cicla en la  
20 temperatura anterior al mismo tiempo para proporcionar una norma. Los índices de sabor de estas cervezas tratadas y no tratadas luego se comparan para determinar la estabilidad mejorada lograda al tratar la cerveza con una enzima de oxoaldehído reductasa. Los resultados de esta prueba  
25 organoléptica luego se comparan a aquellos obtenidos por las mediciones cromatográficas de los índices químicos del sabor

descritos posteriormente.



#### *Análisis de CL18 y 5-HMF*

Se realizaron análisis de los índices químicos LC18 y 5-HMF por cromatografía líquida, usando un sistema Waters HPLC que consistió de una bomba 600, un automuestreador Wisp 717, un manejador de Cromatografía Millennium 2010 de 2.1. La separación se llevó a cabo en una columna Aminex HPX-87H de 300 x 7.8 mm, 9  $\mu$ m mantenida a 55°C. La elución se inspeccionó con un detector de arreglo de fotodiodos Waters 991 (200 mm-300 mm) y la cuantificación de los valores máximos de 5-HMF y LC18 se llevó a cabo a 283 nm. Para el análisis, se inyectaron 50  $\mu$ l de cerveza desgasificada en muestras duplicadas y se eluyeron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 M durante 25 minutos a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. Se realizó la cuantificación de 5-HMF usando una curva de calibración externa de los compuestos puros, respectivos (Sigma, San Luis, Missouri).

#### *Análisis de CE3*

Todas las muestras de las cervezas se desgasificaron en un baño ultrasónico antes de la inyección y se analizaron en duplicado. Se realizaron análisis en un sistema de electroforesis capilar de biosistemas aplicados 270A-HT. Un capilar de sílice fusionado, no tratado de diámetro interno de 50  $\mu$ m y 72 cm de longitud (50 cm para el



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

detector) se usó en todas las separaciones. Las muestras se  
inyectaron al vacío durante 3.5 segundos, y se llevaron a  
cabo las separaciones electroforéticas en el amortiguador de  
citrato de sodio 20 mM, pH 2.5, a un voltaje de 15 KV durante  
5 20 minutos. Se realizó la detección a 200 nm. Se realizó la  
adquisición de un procesamiento de los datos usando los  
elementos de programación del sistema de análisis de datos  
modelo 600 (Applied Biosystems) para Macintosh.

10 *Derivación de los compuestos dicarbonílicos con  
1,2-fenilendiamina y determinación de quinoxalinas  
por HPLC*

Se adicionó un volumen fijo (2.2 ml) de 1,2-  
fenilendiamina al 5 % (OPD) en metanol, a una botella de  
15 cerveza (222 ml) que luego se volvió a tapar y se mantuvo a  
20°C durante 12 horas. Después de 12 de horas de reacción,  
se extrajeron 25 ml de muestra con cloroformo (3 x 8 ml). La  
fase orgánica de cloroformo se removi6 por centrifugación a  
3000 rpm durante 10 minutos, se colectó, se lavó con HCl 0.1  
20 M (3 x 8 ml), a fin de remover la 1,2-fenilendiamina sin  
reaccionar, y se semi-secó con sulfato de magnesio. La fase  
orgánica semisecada, que contuvo los derivados de  
quinoxalina, hidrofóbicos, luego se secó en un rotavapor a  
sequedad, y el residuo se volvió a dispersar en 250 µl de  
25 acetronitrilo, y se diluyó 1/10 (50 % del solvente a y 50 %  
del solvente b) antes del análisis cromatográfico. Las



quinoxalinas hidrofóbicas se analizaron usando (ver posteriormente). La fase acuosa que contiene quinoxalinas hidrofílicas, se inyectó directamente y se analizó usando un método II (ver posteriormente).

5 Las condiciones cromatográficas fueron como sigue:

se usó una columna Nova-Pak C18 (Waters) de 3.9 x 150 mm, 4  $\mu$ m. La fase móvil fue: solvente A-95 % de agua (Milli-Q) y 5 % de acetonitrilo; solvente B-90 % de acetonitrilo y 10 % de agua; velocidad de flujo 0.7 ml/min. La elución se inspeccionó con un detector de arreglo de fotodiodos Water 991, (200 nm-360 nm). Los resultados típicos se muestran en las Figuras 5 y 6

Los Métodos I y II son como sigue.

15

#### Método I

Tiempo (min)	% de Solvente A	% de Solvente B
0	85	15
12	60	40
20	100	0

20



## Método II

Tiempo (min)	% del Solvente A	% del Solvente B
0	100	0
3	100	0
10	75	25
15	75	25

10

*Ejemplo 1: Purificación de la 2-oxoaldehído reductasa dependiente de NADPH a partir de la levadura de cerveza*

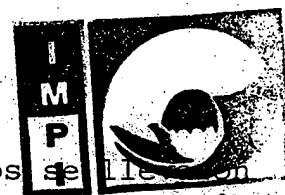
15

Levaduras de cerveza (Polar; Caracas, Venezuela) para la colocación se lavaron dos veces con amortiguador de fosfato de potasio 25 mM pH 7.5, (amortiguador A), se dispersaron en el mismo amortiguador y se rompieron con cuentas de vidrio (diámetro de 0.5 mm) en un Desintegrador-S (IMA) a 3000 rpm durante 10 minutos. Los homogenados celulares se centrifugaron a 1000 xg durante 40 minutos, y el sobrenadante (fracción citosólica) se usó para la purificación de las actividades de oxoaldehído reductasa dependientes de NADPH.

20

Las enzimas se purificaron por cromatografías en columnas, sucesivas en un sistema FPLC (Pharmacia), como se

25

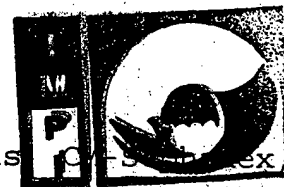


Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

resume en la Figura 7. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 5°C.

La fracción  
citosfólica se aplicó a una columna DEAE-Sepharose  
equilibrada previamente con amortiguador A. La columna se  
lavó primero con el mismo amortiguador y luego con el  
amortiguador A que contiene KCl 250 mM y 500 mM, y la  
cantidad de la enzima se eluyó como dos valores máximos  
(picos). El primer valor máximo (reductasa 1) se eluyó con  
el amortiguador de lavado, y el segundo (reductasa 2) se  
eluyó con el amortiguador que contiene KCl 25 mM. Ambas  
fracciones se combinaron de manera separada y se precipitaron  
por la adición de sulfato de amonio. La reductasa 1 se  
precipitó con sulfato de amonio para dar saturación al 50 %,  
la mezcla se agitó durante 30 minutos a 5°C y luego se  
centrifugó durante 20 minutos a 4360 xg. El sobrenadante  
resultante se llevó a una saturación de sulfato de amonio al  
90 %, se agitó durante 30 minutos y se centrifugó durante 20  
minutos a 4360 xg. La reductasa 2 se precipitó con sulfato  
de amonio para dar una saturación de 80 % y se prosiguió como  
se describe anteriormente. Las pelletillas obtenidas después  
de esta centrifugación se volvieron a dispersar, de manera  
separada, en una mínima cantidad de fosfato de potasio 5 mM,  
pH 6.5 (amortiguador B) y se dializaron durante la noche  
contra el mismo amortiguador.

Las fracciones de las enzimas dializadas se



aplicaron de manera separada en columnas idénticas equilibradas previamente con amortiguador B. En ambos casos, la actividad de la reductasa no se adsorbió a la resina y las proteínas se eluyeron con el amortiguador de equilibrio. Las fracciones con actividad de reductasa se combinaron y concentraron por ultrafiltración con una membrana Amicon YM-10.

Las fracciones de las enzimas combinadas luego se absorbieron separadamente a columnas Cibacron Blue, idénticas equilibradas previamente con fosfato de potasio 25 mM, pH 7.0 (amortiguador C). La reductasa 1 se eluyó con el amortiguador que contiene KCl 400 mM, mientras que la reductasa 2 se eluyó con un gradiente lineal de KCl 0-1 M en el amortiguador C.

Las fracciones que muestran actividad de reductasa se combinaron separadamente y se concentraron a un volumen de 2 ml como se describe previamente, y luego se aplicaron a una columna Sephacryl S-300 equilibrada con amortiguador C.

La reductasa 1 se purificó adicionalmente por medio de una columna Cibacron azul equilibrada con amortiguador C. La columna se lavó con el mismo amortiguador y las proteínas se eluyeron con el amortiguador C que contiene KCl 500 mM.

Como un último paso de purificación, ambas preparaciones de enzima (reductasa 1 y reductasa 2) se sometieron a una columna de fase invertida, preparativa (Pharmacia Biotech Resource RPC 1 ml) conectadas a un sistema



de HPLC plus módulo 1 Waters LC. La elución de la fracción se inspeccionó al medir la absorbancia a 215 nm. Las enzimas purificadas se secaron por congelamiento y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

5 Las actividades de las enzimas de oxoaldehído reductasa, aisladas y purificadas, se determinaron en una mezcla que contiene metilglioxal 9 mM, NADPH, 0.1 mM, amortiguador de fosfato de potasio 20 mM (pH 7.0), y la enzima de la fracción (8  $\mu\text{g}$  aproximadamente) en un volumen  
10 total de 0.5 ml. La reacción se inspeccionó a 340 nm. Todos los ensayos se realizaron a  $25^{\circ}\text{C}$ . Se definió una unidad de la enzima como la cantidad de la enzima que cataliza la oxidación 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto a  $25^{\circ}\text{C}$ .

15 *Ejemplo 2: Caracterización de la reductasa.*

Las fracciones cromatográficas del Ejemplo 1 que mostraron actividad enzimática se usaron para la estimación del peso molecular tanto por la cromatografía de filtración  
20 en gel y la electrofóresis en gel con poliacrilamida al 12.5 % que contiene dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) como se describe por Weber y Osborn (*J. Biol. Chem.* 244:4406-4412 (1969)). La proteína se determinó por el método de Lowy y colaboradores (*J. Biol. Chem.* 193:265-275 (1951)); usando  
25 alguna de suero bovino como una norma.

La filtración en gel, analítica en HPLC se realizó



en una columna Sephacryl S-200 (Waters), que se eluyó con amortiguador C. Ambas enzimas se eluyeron como valores máximos individuales; el peso molecular de la reductasa 1 inactiva, como se determinó por este método, se mostró que es de 8 kDa. Sin embargo, el análisis en SDS-PAGE de reductasa 1 mostró dos bandas principales de pesos moleculares de 44 y 47 kDa (Figura 8), mientras que una banda individual de 39.5 kDa se vio para la reductasa 2 (Figura 9).

### *Ejemplo 3: Ensayos de la especificidad del sustrato*

Se valoraron varios compuestos de carbonilo como sustratos para las enzimas de oxoaldehído reductasa, aisladas y purificadas. Como se muestra en la Figura 10, tanto la reductasa 1 como la reductasa 2 actúan en los 2-oxoaldehídos tal como metilglioxal y 3-desoxiglucosona. La reductasa 1 mostró una actividad superior de la reductasa 2 en los compuestos con un grupo ceto o aldo individual tal como acetaldehído y piridina-3-aldehído. Se encontró que el glucoronato es un mejor sustrato para la reductasa 2 que para la reductasa 1, mientras que la metirapona fue un sustrato aceptable para ambas enzimas. Ambas reductasas mostraron poco o ningún efecto en las aldosas valoradas (glucosa, galactosa y xilosa. Es notable que ninguna enzima mostró alguna actividad apreciable en el piruvato.

Estos resultados de muestran que la reductasa 1 y

la reductasa 2 son químicamente y distinguibles.



*Ejemplo 4: Efecto de las reductasas en LC18.*

5

A fin de determinar el efecto de ambas reductasas en la intensidad del valor máximo de LC18, a 1 ml de mezcla de cerveza fresca, se incubó a 25°C durante 30 minutos una mezcla de 1 ml de cerveza fresca, amortiguador de fosfato de potasio 25 mM (pH 7.0), NADPH 0.1 mM y el volumen requerido de enzima para obtener 50 unidades/ml. Después de la incubación, la cerveza tratada se analizó en una columna Aminex HPX-87H conectada a un sistema Waters de HPLC bajo las condiciones descritas anteriormente.

15

Como se demuestra en la Figura 11, el tratamiento de cerveza con Reductasa 1 o Reductasa 2 provocó una disminución significativa en el área del valor máximo de LC18 (flechas), con relación a aquella en una cerveza no tratada. El tratamiento de la cerveza con Reductasa 1 indujo una disminución más grande en el valor máximo de LC18 que lo que hizo el tratamiento con Reductasa 2, quizás reflejando la actividad específica más alta de la anterior para varios substratos de ceto- y aldo-carbonilo, individuales como se muestra en la Figura 10. Estos resultados demuestran que el tratamiento ya sea con Reductasa 1 o Reductasa 2, y en forma preferente con Reductasa 2, puede reducir la formación de los

20

25



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

índices rancios del sabor tal como LC18 en la cerveza fresca.

*Ejemplo 5: Evaluación del sabor*

5                    Para las evaluaciones sensitivas del sabor de la  
cerveza, se usó un panel de seis catadores experimentados.  
A cada participante se le pidió comparar los perfiles de  
sabor y determinar la presencia o ausencia de los componentes  
del sabor, asociados con el grado de frescura de la cerveza  
10 de las siguientes muestras: 1) cerveza fresca a 5°C; 2)  
cerveza de control a 28°C; y 3) cerveza con reductasas 1  
adicionada a 28°C. La escala usada para reportar el grado de  
frescura de la cerveza fue desde "1" a "5" (con "5" que indica  
el gusto más fresco).

15                    Se prepararon cervezas como sigue:

1) Cervezas de control: 10 ml de cerveza se tomaron  
de cada una de seis botellas de 222 ml de cerveza fresca,  
pasteurizada bajo una corriente de CO<sub>2</sub>. Este volumen se  
reemplazó con 6 ml de amortiguador C y 4 ml de NADPH 3 mM, y  
20 luego las botellas se volvieron a tapar. Tres botellas se  
almacenaron a 5°C durante 15 días y las otras a 28°C durante  
15 días.

2) Cervezas experimentales: 10 ml de cerveza se  
tomaron de cada una de tres botellas de 222 ml de cerveza  
25 fresca, pasteurizada bajo una corriente de CO<sub>2</sub>, y este  
volumen se reemplazó con 5.4 ml de amortiguador A, 4 ml de



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

NADPH 3 mM, y 0.6 ml de reductasa 1. Las botellas se volvieron a tapar y se almacenaron a 28°C durante la noche.

Las cervezas frescas, de control y experimentales luego se sometieron a la evaluación por el panel de catadores. Como se muestra en la Figura 12, estas pruebas de evaluación del sabor demostraron un incremento significativo en el grado de frescura en las cervezas que contienen reductasa 1, comparadas con las cervezas de control a 28°C. Junto con aquellos para la prueba cromatográfica anterior, estos resultados indican que el tratamiento de la cerveza con reductasa 1 estabiliza el sabor de la cerveza.

Habiendo ahora descrito completamente la presente invención, se entenderá por aquellos expertos en la técnica que la misma se puede realizar dentro de un intervalo amplio y equivalente de condiciones, formulaciones y otros parámetros sin que afecte el alcance de la invención o cualquier modalidad de la misma.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en la presente son indicativas del nivel de los expertos en la técnica a la cual pertenece la invención, y se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.





Se hace constar que con relación a esta fe  
mejor método conocido por la solicitante para  
práctica, la presente invención, es el que resulta  
partir de la presente descripción de la invención.

5 Habiéndose descrito la invención como antecede se  
reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

1. Un método para mejorar la estabilidad de sabor de una bebida de malta fermentada que contiene alcohol, caracterizado porque comprende poner en contacto la bebida con una cantidad de estabilizador de sabor de una reductasa oxoaldehído dependiente NADPH de formación natural, producida por levadura de cerveza.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la bebida de malta fermentada es cerveza.
3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o reivindicación 2, caracterizado porque la enzima es una reductasa 3-deoxiglucosona.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la levadura es del genero *Saccharomyces*.



5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque la levadura es la especie de *Saccharomyces cerevisiae*.

5 6. Un método para producir una bebida de malta fermentada que contiene alcohol, el método caracterizado porque comprende las etapas de:

- producir una malta de grano;
- producir un mosto de la malta de grano;
- 10 - añadir una cantidad de estabilizador de sabor de una reductasa oxoaldehído dependiente NADPH de formación natural, producida por levadura de cerveza;
- fermentar mosto para producir una bebida de malta fermentada;
- 15 - procesar la bebida de malta fermentada para producir una bebida de malta fermentada procesada; y
- empacar la bebida de malta fermentada procesada.



**Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial**

7. El método de conformidad reivindicación 6, caracterizado porque la enzima se añade al mosto antes de la fermentación.

5 8. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la enzima se añade a la bebida de malta fermentada antes de la etapa de procesamiento.

10 9. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la enzima se añade a la bebida de malta fermentada antes de la etapa de empaque.



**Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial**

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para estabilizar el sabor de una bebida de malta fermentada, en forma más particular una cerveza, por la adición de una enzima de oxoaldehído reductasa, la bebida de malta fermentada preparada por este método, y al uso durante el proceso de fermentación de enzimas de oxoaldehído reductasa a partir de fuentes naturales, que incluyen aquellas producidas por levaduras, para estabilizar el sabor del producto de cerveza resultante y para producir una cerveza que tiene un sabor estable.

La invención también se refiere a microorganismos, particularmente levaduras, que se han modificado específicamente, se han seleccionado, o se han manejado genéticamente para expresar o segregar una enzima de oxoaldehído reductasa que se puede usar durante el proceso de fermentación, para estabilizar el sabor del producto de cerveza resultante, y para producir una cerveza que tiene un sabor estable. La presente invención también proporciona extractos a partir de una fuente natural (por ejemplo, levadura), o una levadura modificada, o extractos de la misma, los cuales proporcionarán una cantidad suficiente de las enzimas necesarias para bloquear, inhibir o reducir los compuestos intermedios de la reacción de Maillard (por ejemplo, 3-desoxiglucosona, que da por resultado la formación



del sabor rancio en las bebidas de malta fermentada. Además, la presente invención proporciona bebida de malta fermentada que tienen estabilidad mejorada del sabor producida por estos métodos.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

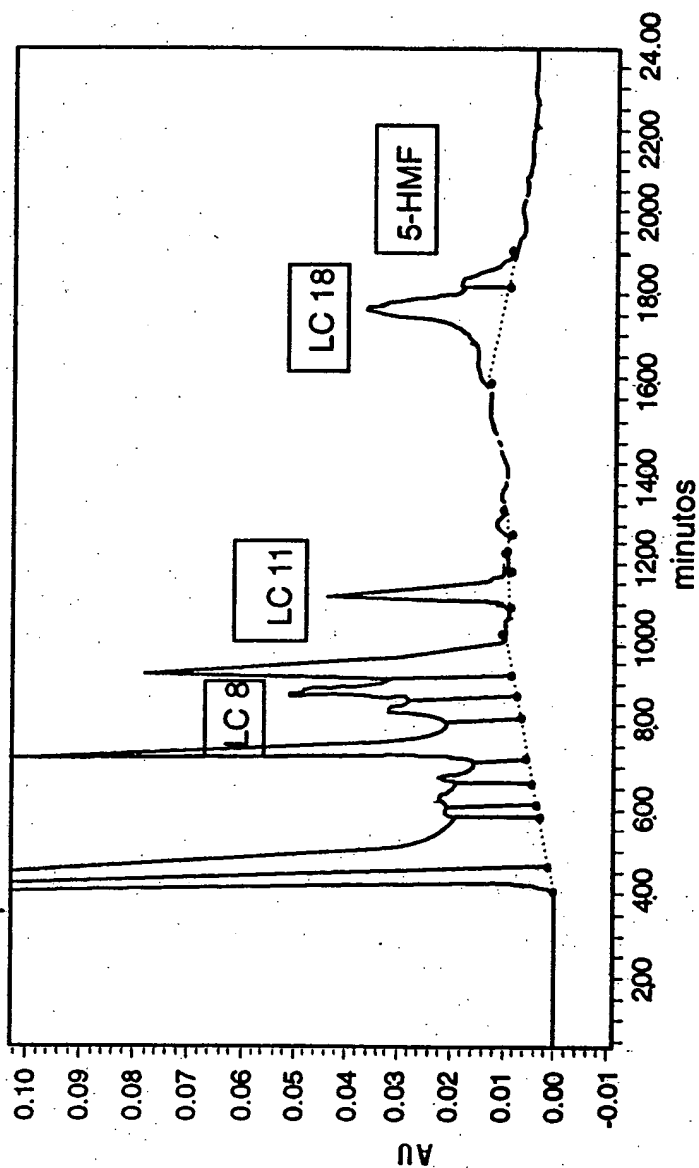
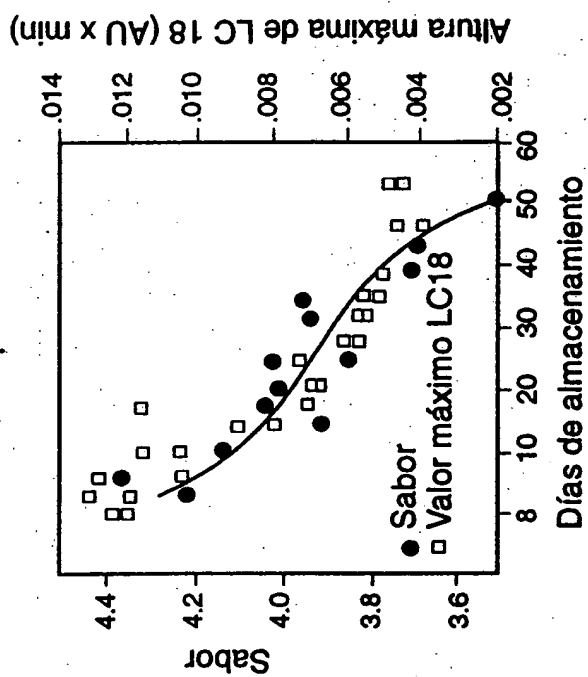
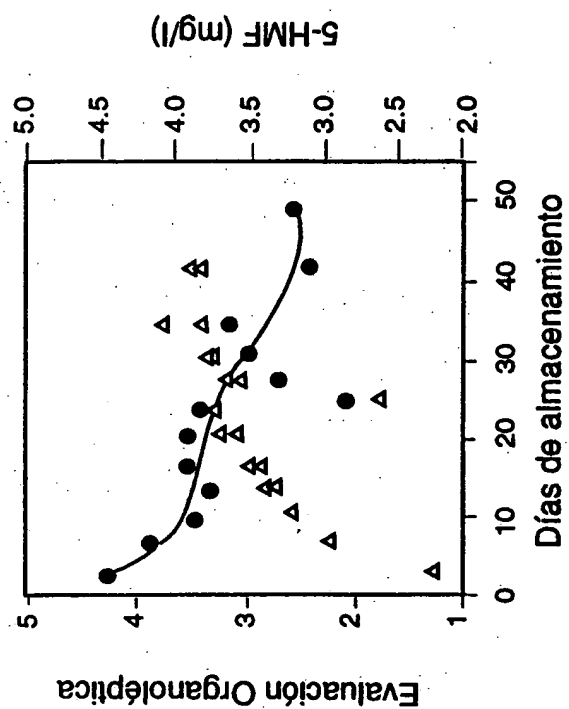


Fig. 1



**Fig. 2a**



**Fig. 2b**



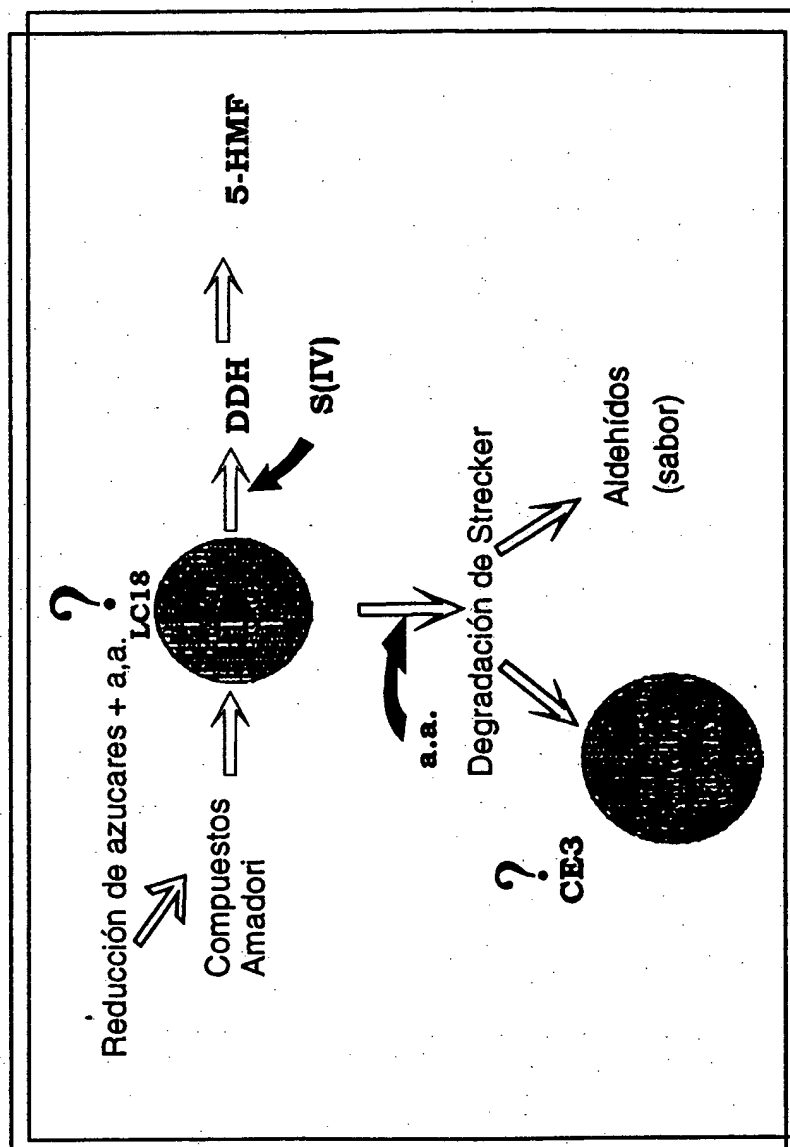
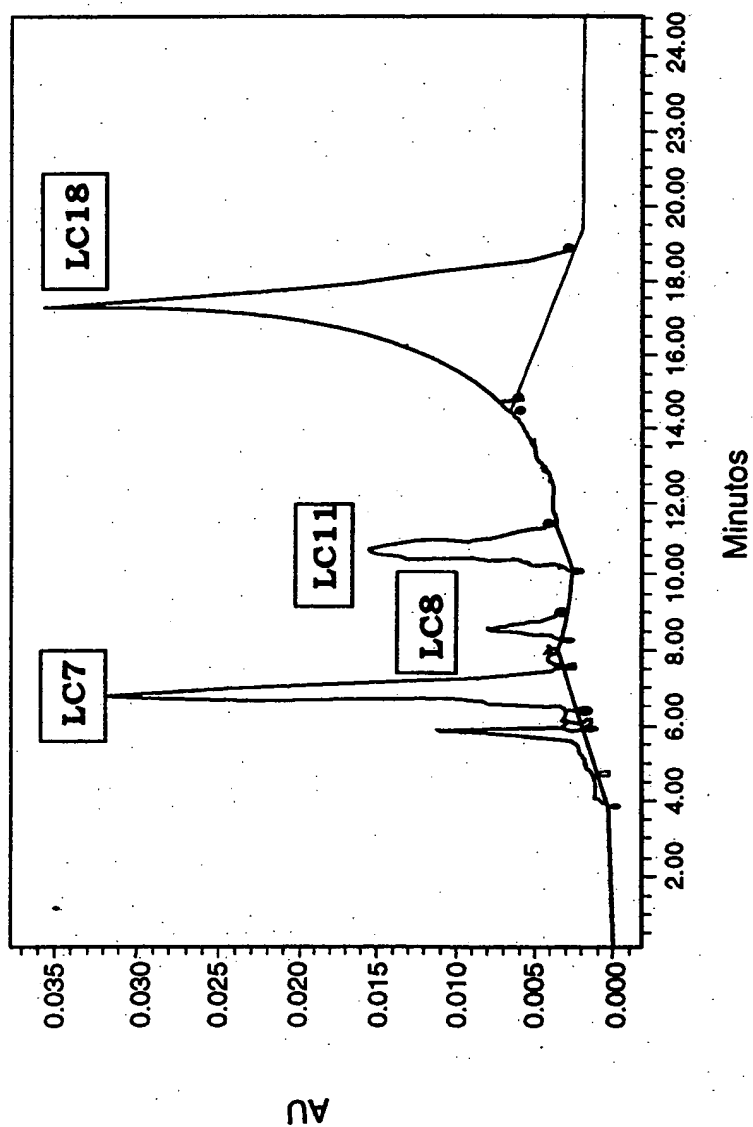
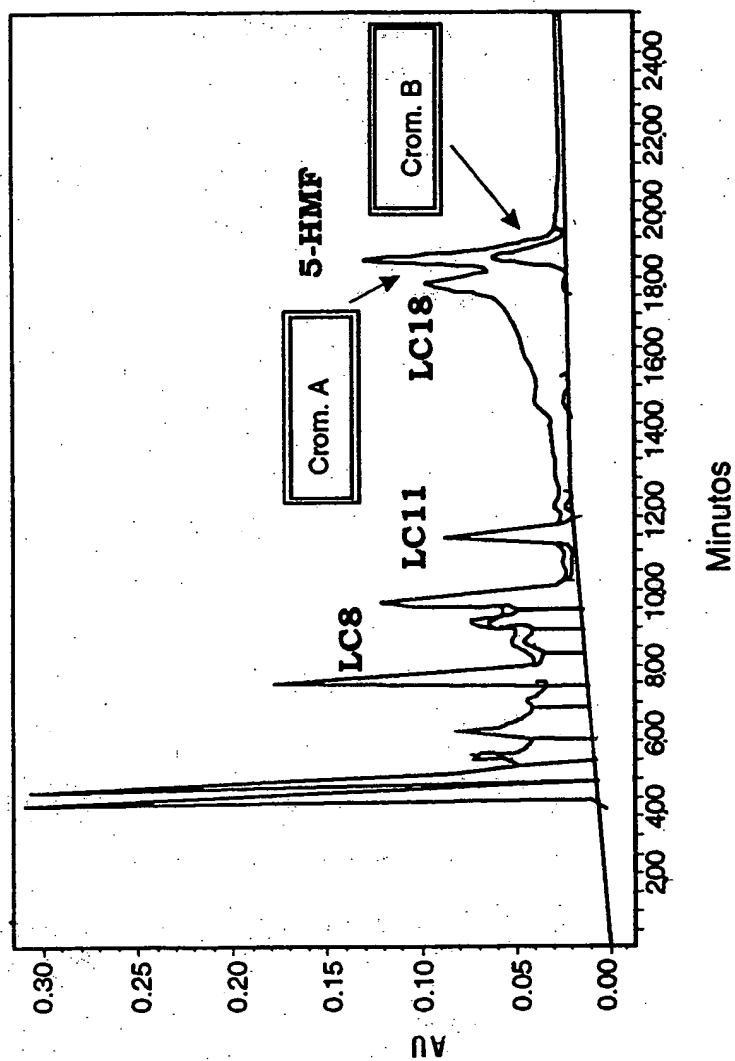


Fig. 3



**Fig. 4**



**Fig. 5**

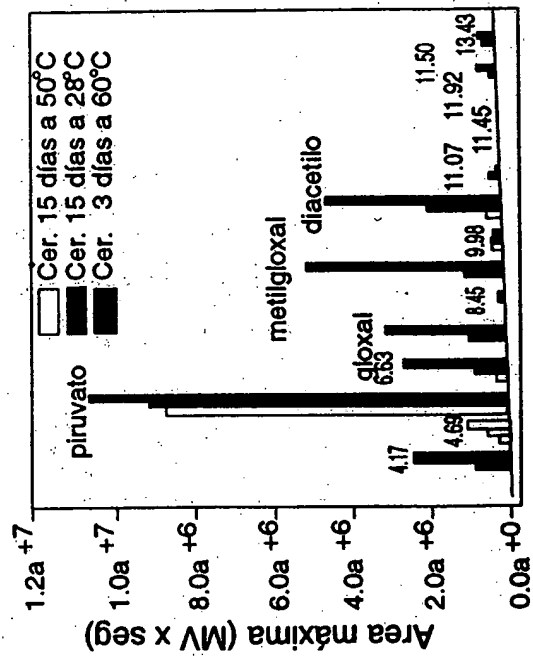


Fig. 6a

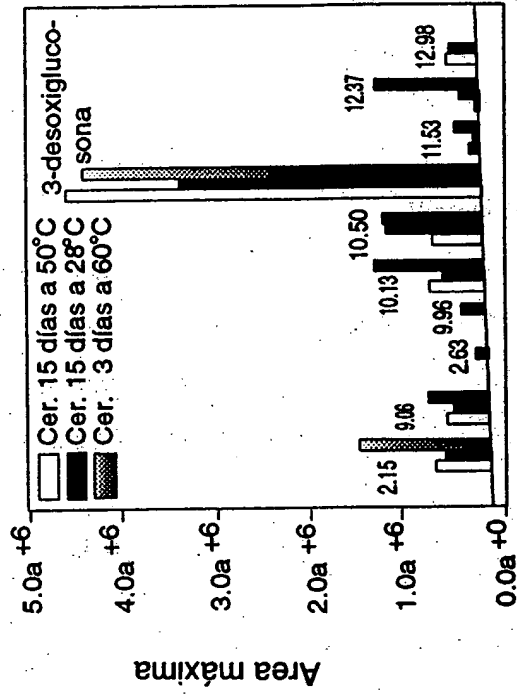
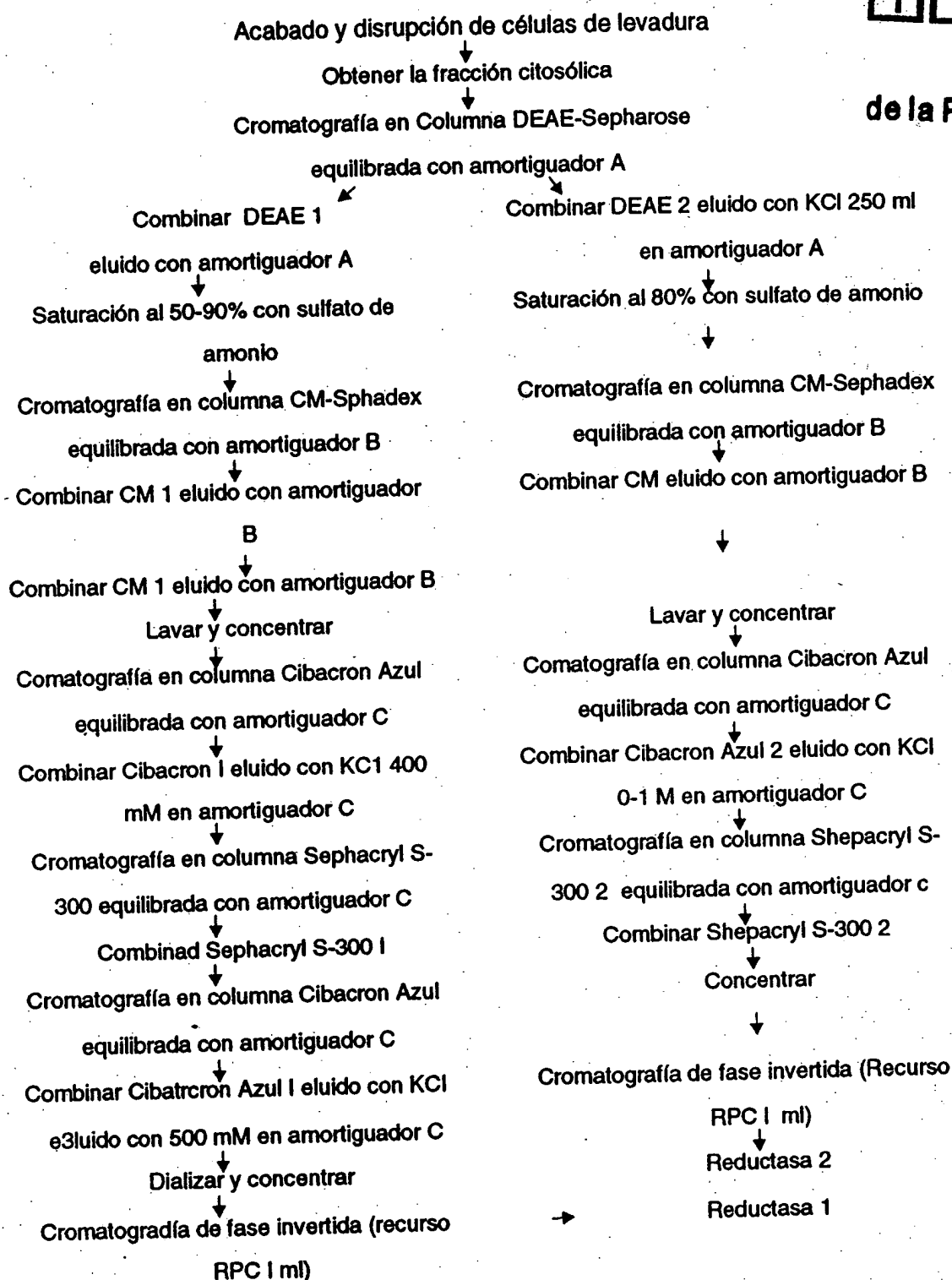


Fig. 6b



**Fig. 7**



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

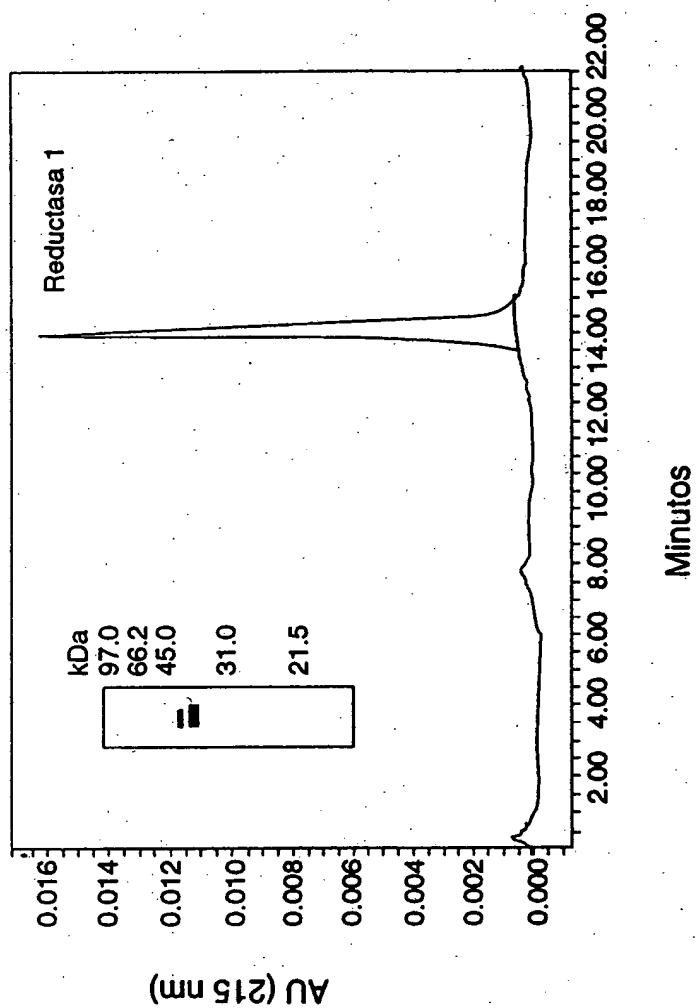
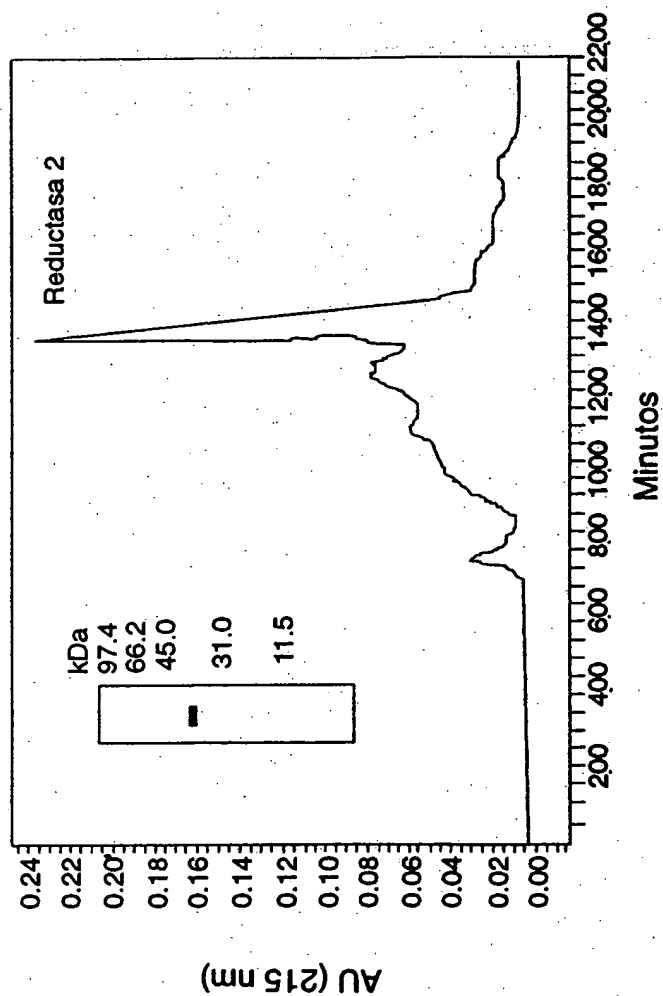


Fig. 8



**Fig. 9**



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

Substrato	Actividad (nmol / min / mg)	
	Reductasa 1	Reductasa 2
Piridina3-aldehido	111.5	0.0
D --glucoronato	7.0	182.1
Acetaldehido	585.8	41.9
Metilgloxal	331.6	230.3
D-glucosa	23.1	0.0
D-galactosa	12.1	0.0
D-xilosa	34.2	0.0
Metirapona	329.6	383.0
2,3-butanodiona	238.1	189.5
2,3-pentanodiona	20.1	0.0
3-desoxiglucosa	190.9	115.1
Piruvato	9.0	0.0

Fig. 10



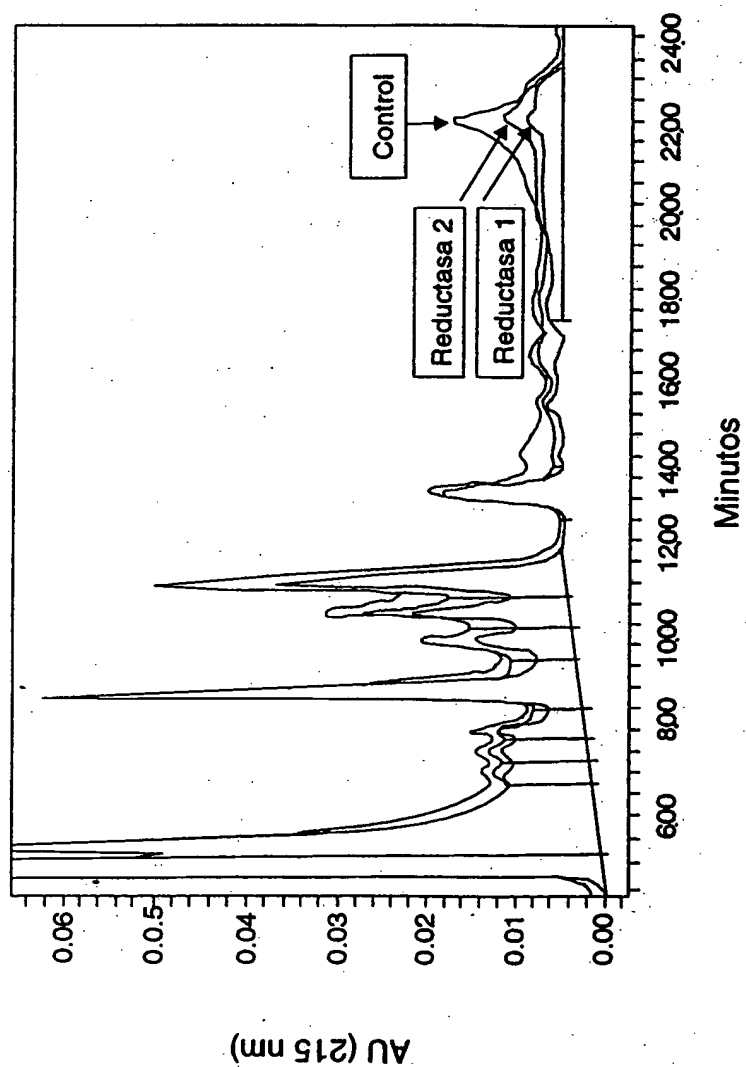


Fig. 11

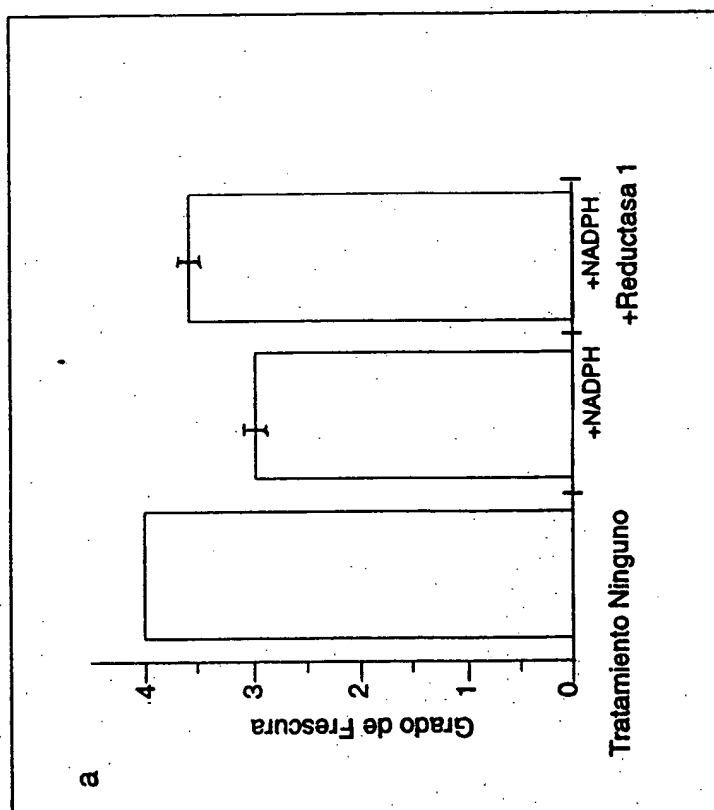
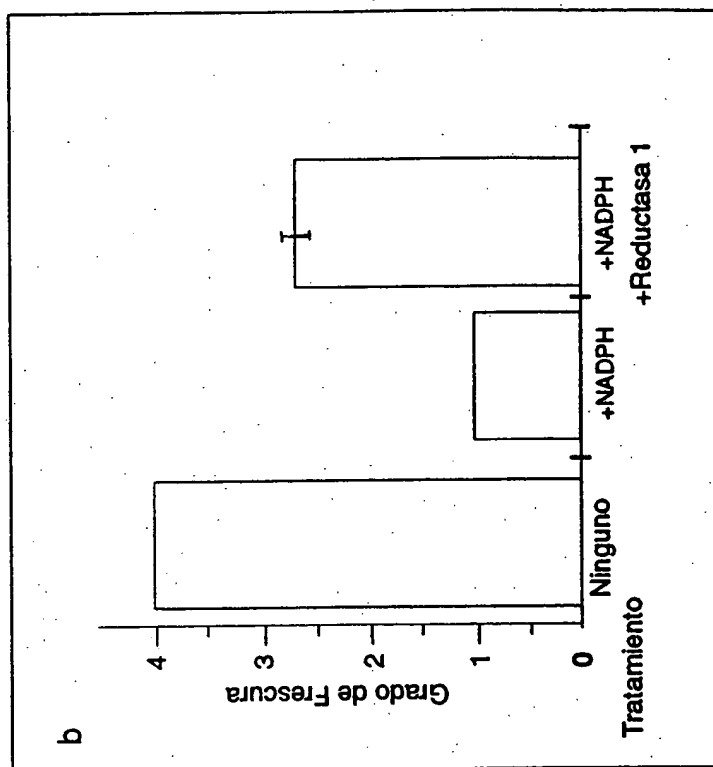


Fig. 12

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**